

Revista **QuímicaViva**- Número 1, año 6, mayo 2007- quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Editorial

“Allá al fondo está la muerte, pero no tenga miedo. Sujete el reloj con una mano, tome con dos dedos la llave de la cuerda, remóntela suavemente. Ahora se abre otro plazo, los árboles despliegan sus hojas, las barcas corren regatas, el tiempo como un abanico se va llenando de sí mismo y de él brotan el aire, las brisas de la tierra, la sombra de una mujer, el perfume del pan”. **Julio Cortázar. Historias de cronopios y de famas. 1962**

En esta primera edición de QuímicaViva del año 2007 la estrella indiscutida de los tres trabajos que se presentan es la célula animal y el exquisito mecanismo que regula su ciclo de vida y muerte. Las células son como minúsculos relojes de cuerda cuyo engranaje funciona si todos sus componentes se relacionan entre sí en forma coordinada. Cuando algo interfiere alterando alguno de los factores se producen cambios nefastos, las células proliferan indefinidamente o mueren en masa. ¿Qué pasa entonces cuando este balance delicado se altera? El organismo enferma y muere. Así ocurre cuando una multitud de bacterias destruye a las células del sistema inmune, no es que las usan de alimento sino que, como copiando la concepción fundamentalista, los inducen a un suicidio masivo. De este modo ganan su batalla matando al individuo.

Los científicos encontraron una forma de evitar esta masacre interfiriendo con algún paso determinante del devenir de la apoptosis, pero es precisamente la exquisita regulación de ese ciclo que conspira en contra de que el tratamiento en humanos no sea tan eficaz como lo es con los modelos murinos. Ejemplos de los variados puntos vulnerables para cortar el ciclo de la apoptosis y los compuestos medicinales en uso los encontrarán en el acápite **Puntos de inflexión**.

El ciclo de división celular está también minuciosamente regulado así nos dice Eduardo Cánepa el autor de la actualización: **Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular** “El ciclo celular consiste en una serie de eventos precisamente coordinados que permiten el crecimiento y la proliferación celular. Para asegurar la correcta progresión a través del ciclo, las células han desarrollado una serie de puntos de control que previenen la entrada en una nueva fase del ciclo hasta que hayan completado exitosamente la anterior”.

Son numerosos los participantes bioquímicos del ciclo, algunos promueven y otros interfieren y cuando ocurre una desregulación las células proliferan y aparece el cáncer. Tema al que nos remite Silvina Gazzaniga con su trabajo

“El papel del infiltrado inflamatorio en tumores: dos caras de una misma moneda” en el que se discute el rol de la respuesta inmune frente a la proliferación celular.

Nos sumerge entonces este número de QViva en el mundo microscópico de la unidad de la vida: la célula. Cuesta creer que tan delicado balance entre división, muerte y proliferación sea el resultado evolutivo de un primigenio Big Bang.

Celia E.Coto



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, diciembre 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Entrevista a la doctora Marta León Monzón

“Las probabilidades de encontrar una vacuna contra el sida son altas”

Por Susana Gallardo



Nació en La Pampa, pero realizó sus estudios en Buenos Aires. Se graduó en la carrera de Química en la Facultad de Ciencias Exactas, y se especializó en virología. Fue la primera ayudante de primera de la cátedra de Virología de la Facultad. En 1978 defendió su tesis doctoral sobre drogas inhibidoras del virus Junín, bajo la dirección de la doctora Celia Coto. Ese mismo año se fue a los Estados Unidos para hacer una pasantía en los Institutos Nacionales de Salud (NIH). Y ya no volvió. Trabajó en la industria, y volvió al NIH, donde, desde 1995, es coordinadora del área de HIV/Sida, en la Oficina de Investigaciones de HIV/Sida. Tiene tres hijos, ninguno de los cuales se volcó a la ciencia, y diez nietos. Dedicó gran parte de su tiempo a la catequesis. Su ex directora de tesis la describe como una persona inteligente, sumamente confiable, muy trabajadora y emprendedora. Su trayectoria impecable no desmiente esta apreciación.

QuímicaViva: ¿En qué consiste su trabajo?

Marta León Monzón: La oficina donde trabajo (Oficina de Investigaciones del Sida, OAR), por mandato del Congreso de los Estados Unidos, tiene que delinear anualmente un plan de investigaciones sobre HIV/Sida, y de acuerdo con ese plan se distribuyen los fondos a los

institutos y centros del NIH que llevan a cabo los proyectos de investigación. El plan incluye prioridades científicas en áreas que requieren mayor atención, por ejemplo, las investigaciones referidas a la prevención de la enfermedad, incluyendo las vacunas, ha sido la principal prioridad en los últimos años. En tiempos de ecorde presupuestario como el presente, los recursos económicos se redirigen para poder solventar los estudios prioritarios. Junto con las investigaciones relacionadas con la prevención, también son prioridades para el sida la capacitación de profesionales y la infraestructura, sección del plan que yo coordino. Entonces, mi trabajo consiste en desarrollar la sección referida a la infraestructura, el entrenamiento y el impulso de la capacitación de instituciones, establecer prioridades, y asignar el presupuesto correspondiente, en coordinación con los institutos y centros.

QuímicaViva: ¿Sigue dedicándose a la investigación?

Marta León Monzón: Nunca he dejado de ser investigadora, esa es una vocación innata. Si bien ya no estoy en un laboratorio diseñando nuevas vacunas, aún me considero una investigadora, ya que mi trabajo requiere la evaluación de prioridades en el momento de distribuir el presupuesto anual. No se puede hacer un trabajo efectivo si no se conoce el estado actual de las investigaciones y no se prevé si una propuesta va a funcionar o no.

QuímicaViva: ¿Cómo se arregló, en los Estados Unidos, para criar tres hijos y, al mismo tiempo, dedicarse a la ciencia?

Marta León Monzón: Muy fácil, querer es poder. Pero hay que tener en cuenta de que se trata de un país muy distinto al nuestro, con otro idioma, y otra cultura. Todos estos factores parecen muy difíciles de superar, pero ayudó el hecho de que no viajé sola, sino con mi esposo, Carlos, que, al comienzo, hizo de padre y madre. Luego los chicos comenzaron a adaptarse y de ahí en más todo salió muy bien. A las madres, Dios nos da cuatro manos para hacer muchas cosas al mismo tiempo. Tampoco necesitamos muchas horas para descansar, de modo que sí se pueden hacer ambas cosas. Mencioné el idioma porque al principio no lo dominaba, y las costumbres que encontramos hicieron que todo fuera extraño y muy distinto, sentíamos una nostalgia muy grande.

QuímicaViva: Sabemos que dedica parte de su tiempo a la catequesis, ¿cómo se conjuga la ciencia con el sentimiento religioso?

Marta León Monzón: Mi inteligencia me llevó a la Facultad de Ciencias Exactas, pero la ciencia nunca impidió que mi religiosidad, aprendida en el hogar, se mantuviera intacta. Los conocimientos ayudan a corroborar la existencia de un ser superior. Mi doctorado, dirigido por la doctora Celia Coto y todos los cursos de perfeccionamiento que he tomado me han afianzado en mi fe. El hecho de que desde hace 20 años sea catequista no ha sido algo decidido por mí, sino que se dio, no por casualidad sino porque así tenía que ser. Comenzó gracias a un sacerdote que confió en mi capacidad, y, luego de un paréntesis de un par de

años, el ser catequista junto con la ciencia y mis nietos se han convertido en los amores de mi vida.

Panorama mundial sobre el HIV

QuímicaViva: ¿Cuáles son hoy los países más afectados por la pandemia del sida?

Marta León Monzón: El número total de personas infectadas que viven actualmente, con datos de diciembre de 2006, es de 39.5 millones. Los países más afectados son Sudáfrica, India, Nigeria, Mozambique, Zimbabwe, Kenya, Tanzania, Zambia, República Democrática del Congo, Uganda, Malawi, Costa de Marfil, y luego Estados Unidos.

QuímicaViva: ¿Cuál es la supervivencia actual de los enfermos de sida?

Marta León Monzón: La supervivencia de las personas infectadas varía; la situación óptima ocurre cuando los pacientes reciben tratamiento adecuado, no desarrollan resistencia a varios antivirales al mismo tiempo, reciben también medicamentos preventivos para combatir otras infecciones y, además, se infectaron con cepas macrófago-trópicas, es decir que afectan a los macrófagos, y usan el correceptor CCR5. Esta supervivencia se reduce significativamente a meses o años dependiendo del intervalo de tiempo que transcurre entre la infección y la detección: a menor tiempo mayor probabilidades de supervivencia. También depende de la edad: los hijos de mujeres infectadas que no reciben tratamiento prenatal o no saben que están infectadas y transmiten el virus a su bebé, ya sea durante el embarazo o al momento del parto o durante la lactancia, muy pocas veces viven más de tres años. Los infectados por vía intravenosa tienen un curso más acelerado de la enfermedad. Las personas infectadas con el virus del sida que además están infectadas con otros virus como el herpes, o el de la hepatitis, por nombrar a los más estudiados, también tienen menos supervivencia. La coinfección con el bacilo de la tuberculosis también acorta la vida de los pacientes HIV positivos.

QuímicaViva: ¿Cuáles son los efectos secundarios de los medicamentos contra el sida?

Marta León Monzón: La infección con el virus del sida causaba hasta 1996 una enfermedad mortal para todos los infectados. Desde que se produjeron muchos más antivirales de distintas clases, la enfermedad se ha convertido para muchos infectados, en los países desarrollados, en una enfermedad crónica. Estas nuevas terapias combinadas han ayudado significativamente a mejorar la calidad de vida de los pacientes, sin embargo muchas otras dificultades han surgido como el desarrollo de cepas resistentes que ocurre cuando el paciente no tiene una total adherencia al tratamiento o sea tomar siempre y de la manera prescrita los remedios. Otras complicaciones son los efectos secundarios que los nuevos antivirales causan en los pacientes y que requieren suspender el tratamiento o recibir otro medicamento para contrarrestar esos efectos.

QuímicaViva: ¿Cuáles siguen siendo, actualmente, los factores de riesgo o los grupos más expuestos a infectarse?

Marta León Monzón: Los factores de riesgo no han cambiado. El virus se transmite sexualmente, ya sea de hombre a mujer o viceversa (heterosexual) o de hombre a hombre (homosexual); por inyección de sustancias mediante el uso de agujas contaminadas (compartiendo jeringas con personas infectadas); por la leche materna de madres infectadas; en algunos países aún se infectan por transfusiones de sangre con productos que contienen el virus por falta de buenos controles en los bancos de sangre. Los factores de riesgo incluyen la falta de educación, la pobreza, el machismo, el estar bajo los efectos del alcohol u otras drogas que disminuyen el sentido de riesgo, no usar preservativos si es que se va a tener una relación sexual, el no saber si la otra persona está infectada o no, el tener muchas parejas...

Vacuna contra el sida

QuímicaViva: ¿Cuáles son las posibilidades concretas de obtener una vacuna contra el sida?

Marta León Monzón: Las probabilidades son altas porque se ha avanzado bastante en este campo aunque es cierto que después de casi 20 años aún no tenemos una vacuna preventiva.

QuímicaViva: Hace alrededor de diez años se pensaba que la vacuna se tendría para el 2010. ¿Se modificó esa meta?

Marta León Monzón: Sí, y la razón fue que la vacuna elaborada con el virus de la viruela del canario no se pudo producir en las cantidades que se necesitaban y con la potencia establecida en las primeras fases de pruebas clínicas. Esta vacuna se obtuvo inicialmente en embriones de pollo, así se produjeron cientos de dosis (que se usaron en las pruebas clínicas de fase 1 y 2) sin embargo, para elaborar primero 15.000 a 20.000 dosis para las pruebas de eficacia, y luego millones de dosis para la población, se pensó adaptar el virus en líneas celulares continuas y la adaptación falló, ya que no se obtuvieron los títulos que se requerían y esa fue una dura lección que aprendimos. Ahora, antes de avanzar a la fase 2, es necesario probar la factibilidad de fabricar cantidades industriales del producto.

QuímicaViva: ¿Por qué es tan difícil alcanzar la vacuna?

Marta León Monzón: El principal factor es la integración del virus en el ADN de las células, el segundo es la elevada proporción de azúcares que cubren la envoltura del virus e impiden el acceso a las proteínas de los anticuerpos, tercero es la mutabilidad del virus, cuarto la falta de un modelo animal apropiado, y las distintas cepas circulantes en el mundo.

QuímicaViva: ¿Cuánto dinero invierte los Estados Unidos para encontrar una vacuna contra el sida?

Marta León Monzón: El presupuesto anual del NIH es más de 600 millones, esta cantidad no incluye al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), ni a la Agencia para el Desarrollo Internacional (USAID), ni al Departamento de Defensa (DOD). Las pocas compañías farmacéuticas invierten unos 2 o 3 millones anuales, la mayoría de ellas están subsidiadas por el NIH, y las organizaciones no gubernamentales, otros cuantos millones. Estados Unidos es el país que más aporta en el mundo.

QuímicaViva: ¿Cuántos protocolos de vacunas hay actualmente en investigación?

Marta León Monzón: En 2006 se iniciaron 13 pruebas de vacunas preventivas en 8 países, de ellas 11 fueron fase 1, y 2 fueron fase 1/2 (una corte de mayor número de participantes que en la fase 1 e incluye personas de bajo y alto riesgo).

QuímicaViva: ¿Se investigan vacunas en otros países, por ejemplo en Europa?

Marta León Monzón: Sí, la Comunidad Europea (Suiza, Gran Bretaña, España, Francia y Alemania) junto con una organización no gubernamental, Iniciativa Internacional por la Vacuna contra el Sida (IAVI, por su sigla en inglés) están desarrollando vacunas que se prueban en la Comunidad Europea y en África. Italia produce una vacuna que utiliza un gen regulatorio que se expresa al comienzo de la infección, conocido con el nombre de tat. También se investiga en la India y en Rusia.

QuímicaViva: ¿Cuando un laboratorio obtenga la vacuna, qué pasará con los otros protocolos?

Marta León Monzón: Aún estamos muy lejos de pensar en esta posibilidad, por el momento se está trabajando aunadamente con todos los grupos, de África, Comunidad Europea, Asia (India, Tailandia y China), Australia, Canadá y Latinoamérica.

QuímicaViva: ¿Cuál es la vacuna que está más cerca de concretarse?

Marta León Monzón: En estos momentos las vacunas que están en fases avanzadas son las que utilizan como vector al adenovirus. Hay dos de estas vacunas, una de Merck/NIH (HVTN) y la segunda que contiene varios genes y tres subtipos de virus circulante producida por el Centro de Vacunas del NIH (VRC, NIAID, NIH). Ambas han terminado las fases 2 y la de Merck ha comenzado dos fases 2B, la primera, que vacinará a tres mil voluntarios en América y África, y la segunda en Sudáfrica, en la que se vacinará a mil quinientos voluntarios.

QuímicaViva: *¿Cuántos y quiénes son los voluntarios que se someten a las pruebas? Es decir, ¿qué edad, sexo, país?*

Marta León Monzón: Los voluntarios para la primera fase son personas altruistas, muchas veces familiares o amigos de personas infectadas, que quieren ayudar a encontrar una vacuna. Estas personas no están infectadas, son saludables y cumplen con los requisitos del protocolo.

QuímicaViva: *Cuando se disponga de la vacuna, ¿su costo será accesible?*

Marta León Monzón: El costo de la vacuna será subsidiado por organizaciones internacionales que ya se han comprometido a hacerlo. Esta fue la razón de la creación del IAVI, siguiendo una preocupación general de los gobernantes y de las personas que trabajamos en este campo.

QuímicaViva: *¿Llegará gratuitamente a los países más pobres, por ejemplo en África?*

Marta León Monzón: Muy probablemente, y, si no es así, el gobierno tendrá que abonar un costo muy reducido.

QuímicaViva: *¿Qué países de América colaboran activamente en este proyecto?*

Marta León Monzón: En las pruebas de vacuna, el país que más activamente está participando es Perú, con dos sitios, uno en Lima y el otro en Iquitos. Brasil es el otro país en Latinoamérica. En el Caribe los más activos son República Dominicana, Haití, Puerto Rico, luego están Jamaica, y Trinidad Tobago. La Argentina, lamentablemente, no participa, pero esperemos que en un futuro cercano sí lo haga.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, Mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves

Celia E. Coto

Profesora Titular Consulta Departamento de Química Biológica.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria.
Pabellón 2. 4to Piso. C1428EGA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

virocoto@qb.fcen.uba.ar

Recibido el 01/04/07. Aceptado el 11/04/07.

Introducción

En la permanente interacción de la especie humana con los microorganismos se pueden anotar triunfos de uno u otro bando. Dicho en forma ligera, principalmente las bacterias y los virus fueron modelando el sistema inmune del hombre, en tanto éste con el uso y abuso de drogas antimicrobianas los ha forzado a modificar sus genomas. De este modo, y debido a la gran plasticidad de los genomas microbianos, las poblaciones naturales u hospitalarias se han convertido en resistentes a las drogas que antes los mataba. Existen numerosas ópticas por las que se puede ver o analizar esta batalla sin fin, ya que muchas acciones humanas, sobre todo los resultados de algunas guerras ocurrieron por la colaboración no solicitada de los microorganismos. Como todos sabemos, los dirigentes actuales especulan con el uso de las armas biológicas, por ahora como excusa o amenaza, aunque invierten ingentes cantidades de dinero en el estudio de los agentes bioterroristas como el virus Ébola. Para el control de las enfermedades infecciosas se dispone de una extensa variedad de antibióticos, antivirales, antifúngicos y un arsenal menor de drogas antiparasitarias. Dada la resistencia de los microorganismos a los compuestos en uso clínico son innumerables los trabajos de investigación y desarrollo dedicados a la búsqueda de nuevos fármacos. Se dispone también de vacunas específicas contra un gran número de virosis y enfermedades bacterianas, aunque no para todas, que se aplican regularmente en la niñez. Por último, la mejor defensa individual es la inmunidad que se logra naturalmente después de sufrir una forma leve de una enfermedad infecciosa. A pesar de la existencia de estas formas de defensa, los científicos siguen buscando nuevas estrategias para aplicar en las enfermedades graves con una mortalidad superior al 60%, para las que no se disponen de vacunas o drogas específicas. Este es el caso, por ejemplo, del shock séptico, el ántrax producido por el *Bacillus anthracis*, la peste

originada por *Yersinia pestis* y la fiebre hemorrágica por virus Ébola. El shock séptico, sepsis o respuesta sistémica (SRIS), es una enfermedad grave causada por una abrumadora infección del torrente sanguíneo por parte de bacterias productoras de toxinas. El virus Ébola pertenece a una familia de virus que causa enfermedad severa en el hombre y en primates. La familia se denomina Filoviridae porque se trata de virus de forma peculiar, son largos filamentos como hilos (ver microfotografía electrónica). Fue aislado de primates africanos y en la misma familia se encuentra el virus de Marburg que causó un brote de fiebre hemorrágica en cuidadores de monos en Alemania. El virus Ébola célebre por haber sido el motivo de una novela aterrizante, que luego fuera llevada al cine, es considerado un agente bioterrorista grado A. Los agentes considerados bajo esta denominación se dividen en A, B y C, siendo los A los más peligrosos porque son considerados como de gran riesgo para la salud de una población. Las propiedades que presenta un agente de estas características es que se diseminan fácilmente de persona a persona, preferentemente por vía aerógena, producen mortalidad alta, causan pánico generalizado y requieren, por parte de las autoridades de la salud, atención especial ya que no existen medidas efectivas para combatirlos.



Microfotografía electrónica de una partícula de virus Ébola.

Características del shock séptico.

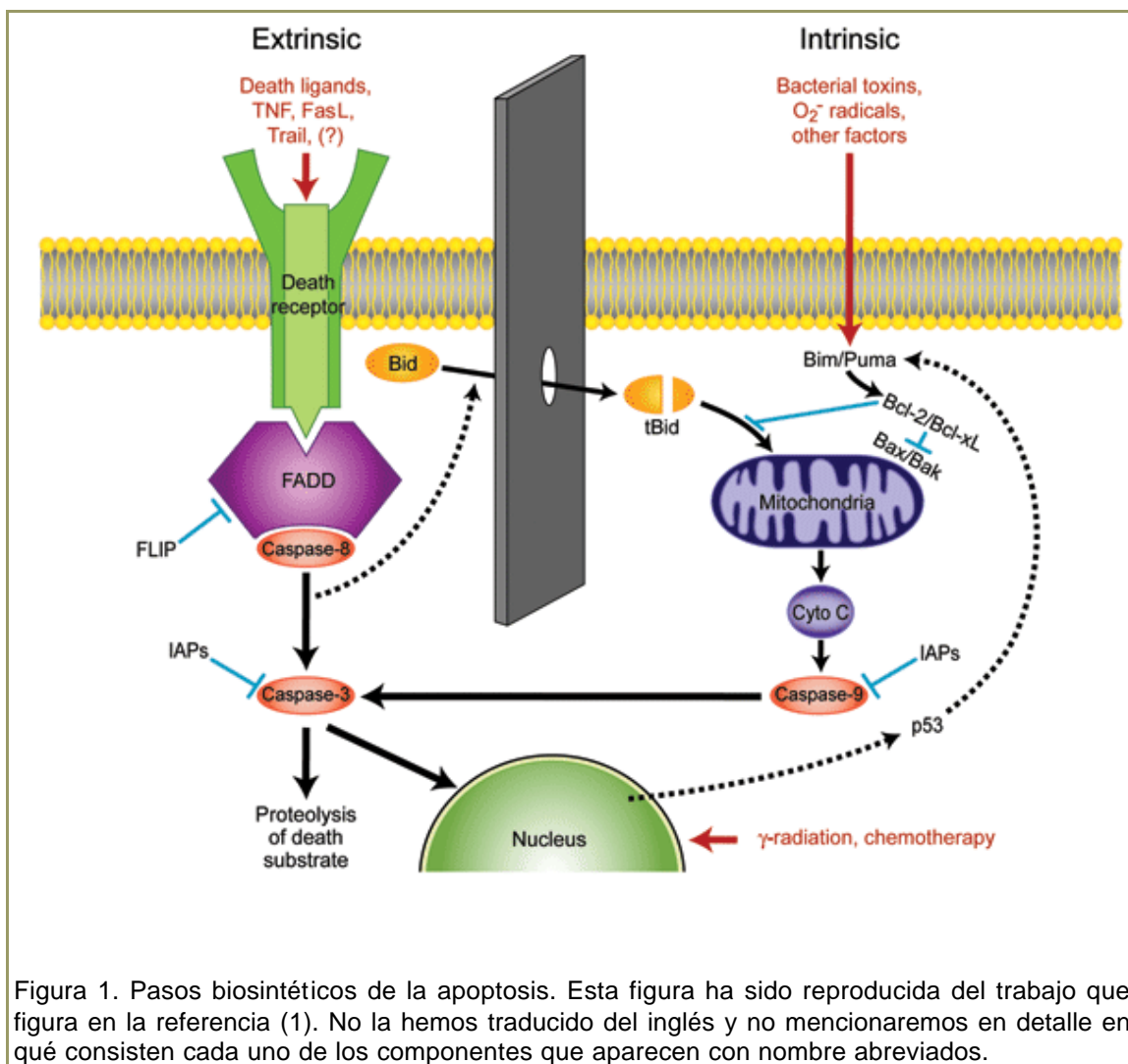
Tanto en pacientes con este síndrome séptico como en modelos animales con sepsis, en la fase final de la enfermedad se produce una destrucción masiva de linfocitos, células dendríticas y células epiteliales intestinales mediante la desregulación de un proceso fisiológico de muerte programada conocido con el nombre de apoptosis. Hay publicaciones que indican que este mismo fenómeno ocurre en la infección por virus Ébola, en los casos de peste y en el ántrax. Dado que la apoptosis es un proceso fisiológico en el que ocurren una serie bastante conocida de procesos bioquímicos, los investigadores han pensado que el bloqueo de algún paso

fundamental de la apoptosis mediante un fármaco atenuaría la severidad de las infecciones mencionadas antes. Efectivamente, trabajos realizados en modelos animales muestran que se producen mejoras notables en el curso de estas infecciones aunque todavía no está todo resuelto.

¿Qué es la apoptosis?

Como todo ser vivo la célula tiene un tiempo para vivir y otro para morir, cuando muere puede ser el resultado de una acción directa de un agente deletéreo o de que la célula se suicida. La muerte por un daño tóxico o mecánico se denomina necrosis y presenta una serie de características. Las organelas, como por ejemplo, las mitocondrias se hinchan porque su membrana plasmática pierde el control del pasaje de los iones y del agua y de este modo se disgrega, los contenidos de la célula se escapan al medio extracelular y se produce una inflamación de los tejidos vecinos. En la apoptosis, en cambio, la célula sufre una serie de transformaciones sucesivas, en forma de pasos muy regulados, por eso se conoce también con el nombre de muerte celular programada. Cuando la célula es inducida a cometer suicidio se encoge, aparecen burbujas en su superficie, la cromatina del núcleo se degrada, se rompen las mitocondrias que liberan citocromo C, quedando pequeños fragmentos membranosos, y la fosfatidilserina que normalmente está dentro de la membrana celular queda expuesta en su superficie. Cuando esto ocurre aparecen receptores a los que se unen los fagocitos que pueden ser macrófagos o células dendríticas que rodean y digieren los restos celulares, a la vez que secretan citoquinas conocidas como IL-10 y TGF- β . para evitar la respuesta inflamatoria. La apoptosis es para la célula un proceso tan propio de ella como la mitosis. Si bien la apoptosis es un proceso fisiológico cuyas funciones puntuales no describiremos aquí, cuando el proceso, en lugar de ser positivo, se desborda puede resultar deletéreo. En la figura 1 mostraremos un esquema de cómo ocurre la apoptosis según el conocimiento actual. Se podrán observar los factores proteicos participantes La inclusión de esta figura no tiene por objeto analizar cada componente sino facilitar la comprensión de cuáles son los puntos clave donde pueden actuar los fármacos para detener el proceso.

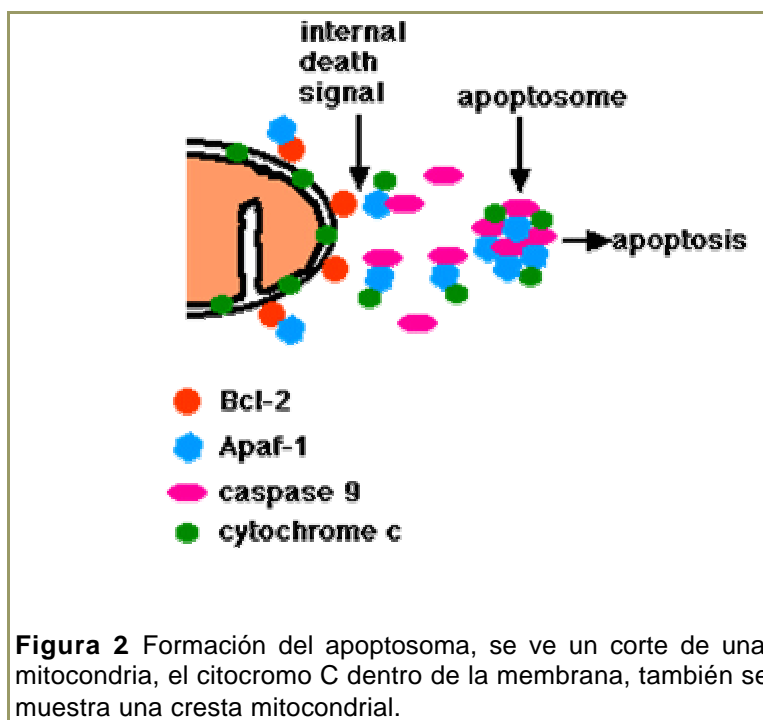
Mecanismo de la apoptosis



La apoptosis puede ser desencadenada por señales internas de las células, en este caso tiene lugar por el denominado camino intrínseco o camino de la mitocondria, los detalles se aprecian en el lado derecho del esquema. O bien puede tener lugar mediante el otro mecanismo apoptótico: el extrínseco que es disparado por señales externas a la célula y es conocido también como el camino de la muerte vía receptor. Estos receptores pertenecen a una familia cuyos miembros están presentes en células distintas. Cuando se produce la unión de estos receptores a proteínas ligando específicas se desencadena una señal de muerte. Los reguladores de la apoptosis pueden dividirse en forma amplia en tres categorías: inductores, efectores y ejecutores. Los inductores, señales externas o agentes genotóxicos como la quimioterapia, la radiación y otros gatillan a los efectores que son cascadas intracelulares que transmiten la señal de muerte (buscan a quien debe cumplir la orden). Los efectores son las cascadas intracelulares al final de la vía que causan la apoptosis (ejecutan la orden) (2).

Camino intrínseco:

Los factores que desencadenan la muerte por este camino pueden ser la presencia de toxinas bacterianas, el efecto de radicales libres de oxígeno o bien la acción de agentes como rayos gamma, o quimioterapia sobre el núcleo. Estos factores activan a dos proteínas conocidas como Bim y Puma que son dos factores pro-apoptóticos que a su vez activan a Bcl-2(B cell leukemia 2), proteína presente en la membrana de la mitocondria, la que a su vez interacciona con una proteína cercana llamada Bax que produce agujeros en la membrana de la organela. Esta acción permite la salida del citocromo C del interior de la mitocondria al citosol donde se une a la proteína Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa apoptótica) y a la procaspasa 9. La unión se realiza con la intervención de ATP, así se forman los llamados apoptosomas (se muestran en la figura 2). Así se activa la procaspasa formándose la caspasa-9. Recordemos que las caspasas, son una familia de proteasas, enzimas que degradan cadenas polipeptídicas.



Volviendo a la figura 1, la caspasa-9 se corta en fragmentos y esto da lugar a una serie de eventos en cascada que termina con la degradación de los componentes celulares y nucleares (inducción de endonucleasas) como muestra la flecha que parte de la caspasa-3, enzima ejecutora a la que apuntan ambos mecanismos, el intrínseco y extrínseco. En el esquema se muestran también los factores llamados IAPs que son inhibidores de la apoptosis y que funcionan en ciertas condiciones pegándose a los apoptosomas. En cuanto a p53 que se libera en caso de daño al núcleo y es un potente inductor de la apoptosis por eso cambios genéticos en el gen de p53 están relacionados con las células cancerosas.

Camino extrínseco

La vía extrínseca involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores de la membrana celular en respuesta a señales (ligandos) extracelulares. Inductores de esta vía son los miembros de la familia TNF (TNF, Fas L, Trail) ligandos de los receptores de muerte celular. Una vez activado el receptor se inicia la fase ejecutora intracelular. Durante esa fase la señal apoptótica puede ser inhibida y la célula logra sobrevivir. Pero una vez pasado cierto punto, no hay retorno y la célula va a morir. Como vemos en la figura 1, FADD está asociado al receptor de muerte y a su vez está en contacto con la caspasa 8, cuando se desenmascara la unión la caspasa 8 al igual que la nueve desencadena una serie en cascada que activa a la caspasa-3 que es la ejecutora. Hay factores como el FLIP que tienen la capacidad de evitar la apoptosis, la conexión entre ambas vías se da por medio de la ruptura de la proteína Bid. La caspasa 8 corta a la proteína y se crea la forma truncada Bid (tBid) que según se ve en el esquema actúa sobre la mitocondria. Sin pretender analizar la función y características de cada factor participante de la muerte celular programada, resalta la complejidad del proceso ya que se trata de un verdadero mecanismo controlado que si se sale de control puede producir grandes daños. No sería extraño, que mientras estamos escribiendo este trabajo, ya se hubiera descubierto algún otro factor proteico.

Factores que previenen la apoptosis de los linfocitos en modelos de sepsis murina.

De acuerdo con la bibliografía se han ensayado diferentes abordajes para frenar el ciclo de la apoptosis, en el cuadro siguiente extraído de la referencia (1) se pueden encontrar algunos fármacos efectivos.

Cuadro 1. Abordajes terapéuticos para evitar la muerte masiva de linfocitos en modelos de sepsis murina.

Estrategia	Factor utilizado	referencias
Prevención del disparo de la vía extrínseca	Bloqueo del ligando Fas utilizando una proteína Fas de fusión.	3
Ídem	Prevención de la expresión Fas por el uso de siRNA	4*
Prevención de la iniciación	Anticuerpos agonistas anti-CD40	5**
Ídem	Uso de péptidos agonistas de Bcl-2	6
Prevención del inicio de la vía intrínseca	Inhibidores de retroproteasas virales	7
Prevención de la fase de ejecución	siRNA anti-caspasa 8	8
Ídem	Tratamiento con inhibidores de caspasas	9

* se puede consultar de qué se trata el RNA de interferencia en la cita 10. ** CD40 es un receptor de muchas células involucradas en la respuesta inmune que tiene actividad antiapoptótica, la estrategia de los autores de este trabajo fue desarrollar un anticuerpo anti – CD40 que actúa como agonista (aumenta la actividad) induciendo la actividad antiapoptótica a mayores niveles.

Conclusiones

Inhibir algún paso del camino de la apoptosis de los linfocitos es otra estrategia que dispone el profesional de la salud para combatir las enfermedades infecciosas severas. Si bien en los modelos murinos esta estrategia ha dado resultados positivos hay que tener en cuenta que la apoptosis es un proceso celular muy regulado cuya manipulación puede tener alcances nocivos no siempre previsibles.

Referencias

1. Janie Padrino, Richard S. Hotchkiss and Mike Bray. 2007. Prevention of immune cell apoptosis as potencial therapeutic strategy for severe infections. *Emerging Infectious Diseases* vol 13. 191-198.
2. Mauricio Cuello F., Sumie Kato C., Anil Sadarangani K., Claudia Saez S., Roger Gejman E., Gareth Owen, Stanley Lipkowitz. 2006 Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esferoidales ováricas en la apoptosis inducida por el ligando Trail en cánceres ginecológicos. *Boletín Escuela de Medicina U.C.Pontificia Universidad, Católica de Chile*. Vol. 31 No1, 5-15.
3. Chung CS, Yang S, Song GY, Lomas J, Wang P, Simms HH, Chaudry IH, Ayala A. 2001. Inhibition of Fas signaling prevents hepatic injury and improves organ blood flow during sepsis. *Surgery* 130 (2). 339-45
4. Doreen E. Wesche-Soldato, Chun-Shiang Chung, Joanne Lomas-Neira, Lesley A. Doughty, Stephen H. Gregory, and Alfred Ayala. 2005. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood*, Vol. 106, No. 7, pp. 2295-2301.
5. Steven J. Schwulst, Mitchell H. Grayson, Peter J. DiPasco, Christopher G. Davis, Tejal S. Brahmabhatt, Thomas A. Ferguson and Richard S. Hotchkiss. 2006. Agonistic Monoclonal Antibody Against CD40 Receptor Decreases Lymphocyte Apoptosis and Improves Survival in Sepsis. *The Journal of Immunology*, 177: 557-565.
6. Richard S. Hotchkiss, Kevin W. McConnell, Kristin Bullok, Christopher G. Davis, Katherine C. Chang, Steven J. Schwulst, Jeffrey C. Dunne, Gunnar P. H. Dietz, Mathias Bähr, Jonathan E. McDunn, Irene E. Karl, Tracey H. Wagner, J. Perren Cobb, Craig M. Coopersmith and David Piwnica-Worms. 2006. TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL Peptides Protect against Sepsis-Induced Lymphocyte Apoptosis In Vivo. *The Journal of Immunology* 176: 5471-5477.
7. Joel G.R. Weaver, Agathe Tarze, Tia C. Moffat, Morgane LeBras, Aurelien Deniaud, Catherine Brenner, Gary D. Bren, Mario Y. Morin, Barbara N. Phenix, Li Dong, Susan X. Jiang, Valerie L. Sim, Bogdan Zurakowski, Jessica Lallier, Heather Hardin, Peter Wettstein, Rolf P.G. van Heeswijk, Andre Douen, Romano T. Kroemer, Sheng T. Hou, Steffany A.L. Bennett, David H. Lynch, Guido Kroemer and Andrew D. Badley.. 2005. Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *J. Clin. Invest.* 115:1828-1838.
8. Doreen E. Wesche-Soldato, Chun-Shiang Chung, Joanne Lomas-Neira, Lesley A. Doughty, Stephen H. Gregory, and Alfred Ayala. 2005. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood*, Vol. 106, No. 7, pp. 2295-2301.

9. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE. 2000. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. Nat Immunol. 1(6):496-501

10. Calvo, JC. 2003. Una nueva visión del ARN: los ARN de interferencia ¿Un nuevo genoma?. QuímicaViva vol 2 nº 3.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, Mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular

Eduardo T. Cánepa *

Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
Ciudad Universitaria Pabellón II piso 4. 1428 Ciudad de Buenos Aires. Argentina

ecanepa@qb.fcen.uba.ar

Recibido el 05/04/07. Aceptado el 19/04/07.

Resumen

El ciclo celular consiste en una serie de eventos precisamente coordinados que permiten el crecimiento y la proliferación celular. Para asegurar la correcta progresión a través del ciclo, las células han desarrollado una serie de puntos de control que previenen la entrada en una nueva fase del ciclo hasta que hayan completado exitosamente la anterior. Los principales componentes de la maquinaria del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), las que, cuando son activadas, permiten a las células pasar de una fase del ciclo a la siguiente. Estas CDK son reguladas positivamente por las ciclinas y negativamente por las proteínas celulares denominadas inhibidores de las CDK (CKI). El cáncer representa una desregulación del ciclo celular y las células tumorales sufren una proliferación descontrolada. Dado que los tumores se originan, a menudo, en tejidos adultos en los que la mayoría de las células se encuentran en estado quiescente, la ventaja proliferativa que presentan las células tumorales se basa en la habilidad de sortear la quiescencia. El conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan este balance entre los estados proliferativo y quiescente, permitirán aclarar el modo por el cual las células normales se convierten en tumorigénicas y el diseño de nuevas estrategias antitumorales.

Palabras clave: ciclo celular – cáncer – proliferación – quiescencia – CDK - ciclinas

Proliferation or quiescence: a critical cellular decision

Abstract

The cell cycle represents a series of tightly integrated events that allow the cell to grow and proliferate. To ensure proper progression through the cell cycle, cells have developed a series

of checkpoints that prevent them from entering into a new phase until they have successfully completed the previous one. Critical parts of the cell cycle machinery are the cyclin-dependent kinases (CDK), which, when activated provide a means for the cell to move from one phase of the cell cycle to the next. The CDKs are regulated positively by cyclins and regulated negatively by naturally occurring CDK inhibitors (CKI). Cancer represents a dysregulation of the cell cycle and tumor cells undergo uncontrolled proliferation. Since tumors most often originate from adult tissues, in which most cells are quiescent, the proliferative advantage of tumor cells arise from their ability to bypass quiescence. Understanding the molecular mechanisms that control this balance between the proliferative and quiescent states, should provide insights into how normal cells become tumorigenic and to design new cancer strategies.

Key words: cell cycle – cancer – proliferation – quiescence – CDK - cyclins

Introducción

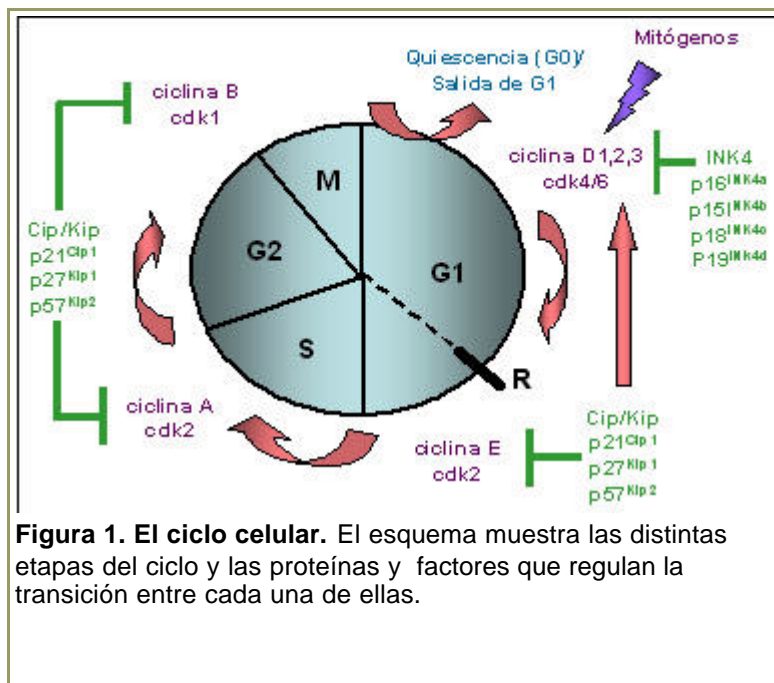
La proliferación celular implica la división mitótica de una célula, luego de la duplicación de su material genético, para dar origen a dos células que, normalmente, son idénticas a la progenitora. El aumento en el número de células de un determinado tejido es inherente a la proliferación. Por el contrario, en el estado de quiescencia, la célula cumple con todas sus funciones específicas, al igual que en el caso anterior, pero sin duplicar su contenido genómico ni dividirse. A estos dos estados diferentes los une, inevitablemente, una de las más cruciales decisiones que toda célula de los metazoos debe adoptar, decisión que, erróneamente tomada, puede causar daños irreversibles y fatales para todo el organismo. Es así que una célula proliferante debe optar entre continuar en el ciclo celular dando otra ronda de división o, por el contrario, quedar en estado de quiescencia. De igual modo, las células quiescentes deben decidir si continuar en un estado no proliferativo o ingresar al ciclo celular y dividirse. Durante el desarrollo temprano, muy pocas células abandonan el ciclo celular, pero en el estado adulto, la mayoría de ellas se encuentran en estado quiescente. Sólo células especializadas, tales como las del sistema hematopoyético, el epitelio intestinal o hepáticas, mantienen una proliferación activa en el organismo adulto. Frente al hecho, entonces, que todas las células proliferantes tienen la capacidad de entrar en quiescencia y, por otro lado, todas las células quiescentes, salvo aquellas que han alcanzado una diferenciación terminal, pueden reingresar al ciclo de división mitótica, surge el interrogante acerca de cuáles son los mecanismos que controlan esta verdadera toma de decisiones celular. Y más inquietante aún, ¿cuáles son las consecuencias asociadas a una desregulación de estos mecanismos? (Hahn and Weinberg, 2002; Hanahan and Weinberg, 2000; Malumbres and Barbacid, 2001). Las células cancerosas muestran, a menudo, alteraciones en los caminos de transducción de señales asociados a la proliferación en respuesta a estímulos externos. De hecho, muchos factores de crecimiento y sus receptores, así como sus intermediarios y efectores localizados en membrana, citoplasma o núcleo han sido identificados como oncogenes o como supresores tumorales. Además de

estos, otros genes mutados en cánceres incluyen aquellos relacionados con la inactivación de la apoptosis, la inducción de la inestabilidad genómica o la promoción de la angiogénesis. La mutación en estas moléculas resulta en una alteración de los mecanismos regulatorios que controlan el ciclo celular (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Blume-Jensen and Hunter, 2001; Sherr, 2004) .

Ciclo básico

El ciclo celular se divide en cuatro fases. Durante dos de ellas las células ejecutan los eventos fundamentales de la división celular: la generación de una copia fiel de su material genético (la fase de síntesis o S) y la partición de todos los componentes celulares entre las dos células hijas (mitosis o fase M). Las otras dos fases del ciclo, G1 y G2, representan períodos de espera (del inglés “gap”) durante los cuales las células se preparan para completar con éxito las fases S y M, respectivamente. Cuando las células cesan de proliferar, ya sea debido a señales antimitogénicas o por la ausencia de señales mitogénicas, egresan del ciclo y entran en el estado de no división quiescente, ya mencionado, y que se conoce como G0 (Lukas and Bartek, 2004). De modo de asegurar la progresión a través del ciclo, las células han desarrollado una serie de puntos de control que evitan el pasaje a una nueva fase del ciclo antes que la anterior haya sido completada exitosamente (Kastan and Bartek, 2004; Lukas et al., 2004; Martin, 2003). Es probable, también, que las células quiescentes deban pasar ciertos puntos de control antes que puedan entrar al ciclo. Por ejemplo, las células deben asegurarse que hayan llegado a su tamaño homeostático y adquirido la masa proteica necesaria ya que, de lo contrario, serán cada vez más pequeñas con cada ronda del ciclo celular. Los metazoos, además, deben controlar el número de células de cada órgano lo cual, junto con el tamaño celular, determinará el tamaño del organismo. Este punto, el crecimiento celular, es minimizado frecuentemente cuando se habla de proliferación. En realidad, ambos eventos deben estar perfectamente coordinados. Solamente en algunos sistemas biológicos, tales como los oocitos, las neuronas o las células musculares, donde puede haber crecimiento sin división, o en los huevos fertilizados, donde ocurre la división celular en ausencia de crecimiento, estos procesos funcionan en forma independiente. En la mayoría de las células, sin embargo, la división celular debe estar acompañada de un crecimiento acorde, de lo contrario, se obtendrán células cada vez más pequeñas lo que puede afectar su viabilidad (Radimerski et al., 2002; Wullschlegel et al., 2006). Los elementos reguladores que controlan estos parámetros no son muy conocidos aunque, con toda seguridad, deben ser influenciados por el medio exterior, ya sea la cantidad de nutrientes disponibles o la información mitogénica recibida en un momento determinado. Evidentemente, el mantener un adecuado equilibrio entre estos dos parámetros es esencial para una correcta división celular. Si las células presentan requerimientos mitogénicos demasiado estrictos, pueden ser incapaces de proliferar cuando sea necesario, por ejemplo en el caso de heridas o durante una infección. Por el contrario, el relajamiento de los requerimientos mitogénicos puede llevar a una proliferación descontrolada con el consiguiente peligro de crecimiento neoplásico. Las células en cultivo tienen un período durante el cual

dependen de la presencia de mitógenos para entrar y continuar en el ciclo, más allá del cual se independizan de ellos. Esta transición se conoce como punto de restricción o punto R y representa un punto de no retorno que compromete a las células a una nueva división celular (Stein et al., 2006).



Moléculas Quinasas dependientes de ciclinas

Las moléculas centrales en el mecanismo de control del ciclo celular (Figura 1) son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas constituyen un grupo de serina/treonina quinasas que forman complejos heterodiméricos activos al unirse a sus subunidades regulatorias, las ciclinas. Varias CDKs, principalmente CDK4, CDK6, CDK2 y posiblemente CDK3, actúan en forma cooperativa para conducir las células hacia la fase S, a través de la fase G1. Las CDK4 y CDK6 están involucradas en el pasaje durante G1 temprano, mientras que CDK2 es requerida para completar G1 e iniciar la fase S. Las primeras forman complejos activos sólo con las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3) y están, desde un punto de vista estructural, estrechamente relacionados y son funcionalmente indiferenciables. Por su parte, la CDK2 es activada secuencialmente por las ciclinas de tipo E (E1 y E2), durante la transición entre las fases G1 y S, y por las ciclinas A (A1 y A2) durante la fase S. Todavía no se conoce el papel desempeñado por la CDK3 y debido a sus bajos niveles de expresión y a su estado inactivo en una gran variedad de tejidos, su participación en el ciclo celular sería prescindible (Murray, 2004; Sandal, 2002).

Ciclinas D Las ciclinas de tipo D desempeñan un papel importante en la integración de las señales mitogénicas y, se puede decir, que constituyen el punto de conexión entre el medio extracelular y el ciclo celular. Una vez que los factores de

crecimiento interaccionan con sus receptores localizados en la membrana plasmática, se dispara una cascada de transducción de señales cuyo eje principal es la vía Ras/Raf/MAPK, uno de cuyos principales lo constituye la síntesis de ciclina D1. Esta ciclina D1, cuya interacción con CDK4/6 permite la entrada de la célula en la fase G1 del ciclo celular, es, a su vez, una molécula muy inestable. La ciclina D1 es blanco de la ubiquitinación por la ligasa SCF y, luego de su transporte desde el núcleo al citoplasma, degradada por el sistema de proteosoma. Esta exportación nuclear, luego de la ubiquitinación, es mediada por la enzima glucógeno sintetasa quinasa 3- β (GSK3), una quinasa que es inhibida por la vía de señalización Ras/PI3K/AKT. De este modo, la disponibilidad de ciclina D1 es controlada por un balance entre su síntesis, dependiente de Ras/Raf/MAPK y su estabilidad, dependiente de Ras/PI3K/AKT, por un lado y la actividad de GSK3 y SCF, por el otro. Sin embargo, recientemente se ha visto que las células que carecen de ciclina D1 pueden proliferar, indicando que esta molécula no sería estrictamente necesaria para la entrada en fase G1. Como las tres ciclinas D presentan una homología muy alta y son coexpresadas en la mayoría de los tejidos, es posible que sus funciones tengan redundancia (Lutzen et al., 2004; Murray, 2004; Ortega et al., 2002).

Reguladores de CDK Se deduce que, regulando la actividad de las CDK, es posible controlar la entrada de las células al ciclo celular. Como ya se mencionó, las CDK pueden ser reguladas positivamente a través de su unión con las ciclinas, pero también negativamente por medio de su interacción con los inhibidores de CDK (CKI) (Sherr and Roberts, 1999). La actividad de las CDK es regulada también por fosforilación; éstas deben ser fosforiladas en un residuo treonina (T172 en CDK4 y T160 en CDK2) que causa una modificación en la conformación de la proteína y un aumento en la exposición del sitio catalítico. Esta modificación es llevada a cabo por el complejo CDK7/ciclina H, también conocida como CAK (quinasa activadora de CDK). También hay fosforilaciones inhibitorias, como las que se realizan en la CDK1 sobre los residuos T14 y Y15 y que son catalizadas por quinasas específicas como las Wee1 y MYT1. Esta inhibición es anulada cuando las fosfatasa CDC25A y CDC25B defosforilan dichos residuos (Donzelli and Draetta, 2003; Essers et al., 2005). Los CKI se dividen dos familias, cada una de ellas constituida por varios miembros, de acuerdo a las CDK que inhiben. La familia INK4 consta de cuatro proteínas, p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d, que ejercen su acción inhibitoria sobre las CDK4 y CDK6, uniéndose a ellas e impidiendo su asociación con las ciclinas de tipo D. Estas proteínas son estructuralmente muy relacionadas e igualmente potentes como inhibidores por lo que sus funciones aparentarían cierta redundancia. Recientemente, sin embargo, se han descripto funciones diferentes en algunas de ellas relacionadas con diversos procesos metabólicos como la reparación del DNA, senescencia y diferenciación (Cunningham and Roussel, 2001; Roussel, 1999). La familia restante, la de los inhibidores Cip/Kip, la constituyen tres miembros conocidos como p21Cip1/Waf1, p27Kip1 y p57Kip2. Estos forman complejos heterotriméricos con las CDK y ciclinas restantes inhibiendo, de este modo, su actividad quinasa. Hay evidencias que estos inhibidores no sólo no inhibirían los complejos CDK4/6 sino que, por el contrario, aumentarían su actividad favoreciendo la estabilidad de su unión con la ciclina D1. Los CKI son

inducidos por una gran variedad de estímulos en respuesta a diferentes procesos metabólicos, regulación que, en muchos casos, aún no es completamente conocida (Pei and Xiong, 2005; Vidal and Koff, 2000). Sustratos de CDK Los principales sustratos de las CDK4/6 y CDK2 son las proteínas que se incluyen en la familia retinoblastoma (Rb), es decir la proteína retinoblastoma propiamente dicha, p107 y p130. Estas proteínas interaccionan con la familia de factores de transcripción E2F de modo de mantenerlos inactivos durante la fase M y en G0. Los complejos Rb-E2F participan en la represión activa de los promotores de ciertos genes, involucrados en la proliferación celular. Este mecanismo de represión involucra el reclutamiento, por medio del complejo Rb-E2F, de proteínas involucradas en el mantenimiento de una estructura cerrada de la cromatina, tales como histona deacetilasas e histona metiltransferasas. La actividad de las proteínas Rb es modulada por la fosforilación secuencial catalizada por los complejos CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E y, en menor medida, por la acetilación mediada por histona acetiltransferasas como p300/CBP. La hiperfosforilación de las proteínas Rb, libera las moléculas que permanecían unidas en las isoformas hipofosforiladas de Rb, principalmente los factores E2F, permitiendo la prosecución hacia otras etapas del ciclo celular (Trimarchi and Lees, 2002).

Regulación de la fase G1 en células normales

Durante la fase G1 temprana las células integran la información proveniente de los estímulos mitogénicos y de la disponibilidad de nutrientes y se preparan para comenzar la proliferación y el pasaje a través de las siguientes fases del ciclo celular. Como ya vimos, la activación de las vías de transducción apropiadas genera un aumento en los niveles nucleares de ciclinas de tipo D con la subsecuente formación de los complejos con las CDK4/6 y su posterior activación. La proteína Rb comienza a ser parcialmente fosforilada, lo que resulta en la activación de los factores de transcripción de la familia E2F quienes, interaccionando con los factores DP, inducen la expresión de un gran número de genes. Las moléculas proteicas generadas en respuesta a esta activación, entre ellas la ciclina E, son requeridas para completar la fase G1. El aumento de ciclina E, permite la activación de CDK2 que fosforila a su vez a la proteína Rb permitiendo una mayor disponibilidad de factores E2F-DP lo que asegura la síntesis de las proteínas necesaria para el ingreso en la siguiente fase del ciclo, la fase S. En esta situación la prosecución a lo largo del ciclo celular se haría independiente del influjo de mitógenos, ya que la actividad CDK2-ciclina E reemplazaría al complejo CDK4/6-ciclina D en la fosforilación de Rb y, por ende, en la activación de los factores E2F (Attwooll et al., 2004; Cam and Dynlacht, 2003). Las CDK4/6 contribuyen a la activación de CDK2 de dos modos. El primero, como ya se mencionó, fosforilando parcialmente a Rb e incrementando la síntesis de su subunidad regulatoria, la ciclina E. La segunda, por medio de la formación de complejos heterotriméricos CDK4/6-ciclina D-inhibidores Cip/Kip. Esta interacción impide que esta familia de CKI inhiba la naciente actividad de CDK2, permitiendo la transición G1/S. Al alcanzarse esta transición, la aparición de los inhibidores de la familia INK4, desplazan a la ciclina D de su interacción con CDK4/6, lo que lleva a la degradación de ciclina D, según ya se vio, y a la liberación de los

inhibidores Cip/Kip, secuestrados por el complejo mencionado. El aumento de los niveles de estos inhibidores Cip/Kip, conducen a la inactivación de CDK2 y la degradación de ciclina E, ya que es sustrato de una ubiquitin ligasa específica. En estos momentos, han aumentado los niveles de ciclina A, que reemplaza a la anterior en su unión a CDK2, permitiendo la continuidad del ciclo a través de la fase S. Es evidente que, para una nueva ronda de proliferación, se necesitará de una renovada estimulación con factores mitogénicos (Massague, 2004).

Alteraciones en proteínas del ciclo celular encontradas en tumores humanos

El análisis genético y molecular de neoplasias desarrolladas en seres humanos demuestra que, en la gran mayoría de ellos, se encuentran mutaciones o alteraciones en la expresión de genes que codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular. Este hecho subraya la importancia del estricto control que debe ser mantenido sobre el equilibrio quiescencia–proliferación para la prevención del cáncer en humanos. Es este el motivo por el cual, prácticamente en todos los tumores, hay algún tipo de mutación o alteración de la expresión en elementos del ciclo que gobiernan el pasaje por la fase G1 o la transición G1/S. El eje ciclina D–CDK4/6–INK4–Rb se encuentra casi universalmente alterado en los cánceres humanos. Si bien en algunos tumores se registra la pérdida por mutación de Rb, la mayoría de ellos conservan una proteína Rb salvaje, pero tienen fuertemente incrementada la actividad del complejo ciclina D-CDK4/6 debido a múltiples factores. El principal mecanismo para el aumento de esta actividad corresponde a la inhibición de la familia de inhibidores INK4, especialmente p16INK4a, ya sea por supresión parcial del gen, mutaciones puntuales o silenciamiento transcripcional por metilación de su promotor. Este bloqueo de p16INK4a permite a las células, durante la evolución maligna, sortear la senescencia y la deja con una alta actividad de CDK4/6 lo que se traduce en una ventaja proliferativa y de crecimiento. La proteína p16INK4a es, por lo tanto, un supresor tumoral muy importante, habiéndose demostrado que, ratones que tienen anulado el gen para dicha proteína, presentan una marcada predisposición a la tumorigénesis. Otros mecanismos alternativos para la alteración del eje mencionado consisten en la amplificación del gen de CDK4, con el consiguiente aumento en el número de moléculas proteicas, lo que incrementa significativamente la actividad proliferativa, y la mutación conocida como CDK4R24C. Esta mutación puntual en el gen de la CDK4, frecuente en melanomas muy agresivos, resulta en una CDK4 sin capacidad de unirse a las proteínas INK4, por lo que mantiene una actividad catalítica prácticamente constitutiva. Estos factores que predisponen a la formación de tumores: la pérdida de Rb, la inactivación de p16INK4a y la amplificación o mutación de CDK4, son eventos mutuamente excluyentes. Se ha visto que, en modelos animales, la expresión de la mutante CDK4R24C y la supresión de las proteínas INK4 no actúan en forma cooperativa en el desarrollo de tumores, siendo este hecho consistente con la hipótesis que indica que la función primaria de las proteínas de la familia INK4 es la inhibición

de la actividad de CDK4 (Lowe et al., 2004; Shapiro, 2006). Otro evento común en el desarrollo de tumores es la sobreexpresión de ciclina D1, debida a rearrreglos cromosomales, que se presenta en hiperplasias mamarias, linfomas y mielomas, o por amplificación génica. También se ha observado un “splicing” alternativo del mRNA de ciclina D1, obteniéndose un transcripto que codifica a la ciclina D1b a la que le falta el extremo carboxilo. En este extremo se ubica la treonina 286 que es fosforilada por la GSK3 que, como se mencionó más arriba, señala para la exportación nuclear y ulterior degradación de dicha ciclina. Esta variante, entonces, es constitutivamente nuclear exhibiendo una elevada capacidad transformadora sugiriendo que la disponibilidad de la ciclina D1 en el núcleo y su mayor estabilidad es un factor más importante para la tumorigenicidad que la sobreexpresión. Al contrario de lo que ocurre con CDK4, la sobreexpresión de ciclina D1 a menudo es acompañada por la pérdida de la función de las INK4, sugiriendo que ambos eventos cooperan en la promoción de la transformación oncogénica. Por otro lado, la pérdida de p16INK4a o la sobreexpresión de ciclina D1 incrementa la cantidad de CDK4 disponible para su ensamblado con ciclina D y con las proteínas de la familia Cip/Kip. Este secuestro de los inhibidores Cip/Kip por el complejo CDK4/6-ciclina D resulta en una mayor activación de CDK2-ciclina E y, por ende, en un incremento de la fosforilación e inactivación de la proteína retinoblastoma. Por lo tanto, el aumento de la actividad de CDK2 y de la capacidad proliferativa celular, es también consecuencia de alguna de las alteraciones descriptas en el eje ciclina D-CDK4/6-INK4-Rb. En algunos tumores se encuentra una forma hiperactiva de ciclina E, de bajo peso molecular, generada por proteólisis debida a la acción de la elastasa o la calpaína o la presencia de niveles disminuidos del inhibidor p27Kip1 como resultado de un incremento en su degradación mediada por proteasoma. Ambas situaciones dan como consecuencia una proliferación celular aumentada (Malumbres and Barbacid, 2001; Massague, 2004; Schwartz and Shah, 2005).

Conclusiones

Podemos considerar el cáncer como una patología del ciclo celular. En forma precisa, una enfermedad restringida al inicio del ciclo, es decir la fase G1 y la transición hacia la fase S. En estas etapas, residirían los eventos moleculares críticos, cuya desregulación, habilita, potencialmente, la formación de tumores. Aunque, como hemos visto, muchos mecanismos reguladores específicos del ciclo celular han sido estudiados en profundidad in vitro, quedan todavía muchas incógnitas acerca de cómo estos procesos celulares están desregulados en forma coordinada con la división celular en cánceres humanos. Los estudios actuales se han focalizado en aspectos cruciales de la regulación del ciclo celular in vivo, tales como los caminos de síntesis y degradación o proteólisis de proteínas esenciales para el ciclo, su regulación por modificaciones postraduccionales y las funciones redundantes o específicas entre los miembros de las distintas familias de proteínas intervinientes, en especial las de los CKI. La estrecha relación entre el ciclo celular y el cáncer se ve reflejada en el gran número de terapias antitumorales, en distintas fases de los estudios clínicos, que apuntan a algunos de los mecanismos que gobiernan las etapas mencionadas del ciclo celular.

Referencias

- Attwooll, C., Denchi, E. L., and Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *Embo J*.
- Ben-Porath, I., and Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 961-76.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-65.
- Cam, H., and Dynlacht, B. D. (2003). Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* **3**, 311-6.
- Cunningham, J. J., and Roussel, M. F. (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ* **12**, 387-96.
- Donzelli, M., and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**, 671-7.
- Essers, J., van Cappellen, W. A., Theil, A. F., van Drunen, E., Jaspers, N. G., Hoeijmakers, J. H., Wyman, C., Vermeulen, W., and Kanaar, R. (2005). Dynamics of relative chromosome position during the cell cycle. *Mol Biol Cell* **16**, 769-75.
- Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 331-41.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323.
- Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-15.
- Lukas, J., and Bartek, J. (2004). Cell division: the heart of the cycle. *Nature* **432**, 564-7.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**, 997-1007.
- Lutzen, A., Bisgaard, H. C., and Rasmussen, L. J. (2004). Cyclin D1 expression and cell cycle response in DNA mismatch repair-deficient cells upon methylation and UV-C damage. *Exp Cell Res* **292**, 123-34.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 222-31.
- Martin, G. S. (2003). Cell signaling and cancer. *Cancer Cell* **4**, 167-74.
- Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-34.
- Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1602**, 73-87.
- Pei, X. H., and Xiong, Y. (2005). Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* **24**, 2787-95.

- Radimerski, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., van der Kaay, J., Downes, C. P., Hafen, E., and Thomas, G. (2002). dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nat Cell Biol* **4**, 251-5.
- Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* **18**, 5311-7.
- Sandal, T. (2002). Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist* **7**, 73-81.
- Schwartz, G. K., and Shah, M. A. (2005). Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* **23**, 9408-21.
- Shapiro, G. I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* **24**, 1770-83.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-46.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.
- Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., Montecino, M., Zaidi, S. K., and Braastad, C. (2006). An architectural perspective of cell-cycle control at the G1/S phase cell-cycle transition. *J Cell Physiol* **209**, 706-10.
- Trimarchi, J. M., and Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 11-20.
- Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247**, 1-15.
- Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-84.

*Doctor en Ciencias Químicas Profesor Adjunto DE Investigador Independiente CONICET



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, Mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

El papel del infiltrado inflamatorio en tumores: dos caras de una misma moneda

Silvina Gazzaniga

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4° piso, Núñez (1428),
Capital Federal, Argentina. Fax: 54-11-4576-3342

sgazza@qb.fcen.uba.ar

Recibido el 15/03/07. Aceptado el 15/04/07.

Resumen

El desarrollo y progresión tumoral es un proceso regulado por las propiedades de las células tumorales en sí mismas pero también por el microambiente circundante. En el estroma tumoral se encuentran fibroblastos, células endoteliales, células mononucleares, macrófagos, linfocitos, células B activadas y neutrófilos; participando conjuntamente en procesos de destrucción y reparación del tejido que suceden simultáneamente. De la interrelación entre células inflamatorias, citoquinas, quimioquinas surge una componente clave que puede definir el destino del tumor. Así, el reclutamiento de leucocitos en el sitio tumoral es consecuencia de un balance entre la respuesta antitumoral que desarrolla el huésped y los mediadores inflamatorios que pueden inducir o facilitar la invasión del tumor primario. Esta revisión no pretende ser exhaustiva, sino tan sólo intenta delinear algunos de los puntos relacionados al papel de la inflamación en el tumor, con cierto énfasis en la experiencia personal en el tema. Del conjunto surge la idea de la importancia de considerar nuevos enfoques y blancos moleculares y celulares a las terapias actualmente existentes para el tratamiento de tumores.

Palabras clave: infiltrado inflamatorio; macrófagos; tumores

The role of the inflammatory infiltrate to tumors: two faces of the same coin

Abstract

The development and progression in tumors is a process regulated by intrinsic properties of the tumor cells, as well as by the surrounding microenvironment. Tumor stroma is composed by fibroblasts, endothelial cells, mononuclear cells, macrophages, lymphocytes, plasma cells and neutrophils, taking part in active tissue destruction and repair, processes which proceed simultaneously. As a result of the interplay among tumor cells on one hand, and inflammatory cells, cytokines, chemokines on the other, a key component emerges that could define tumor fate. Leukocyte recruitment to the tumor site is the consequence of a balance between the antitumor response developed by the host and inflammatory mediators, which could induce or facilitate the invasion of the primary tumor. The purpose of the present revision is not an exhaustive overview but intends to outline some topics related to the role of tumor inflammatory scenario, with some emphasis coming from the personal experience in the subject. On the whole, the idea rises about the importance to consider new molecular and cellular targets and approaches to the existing therapeutics to tumors.

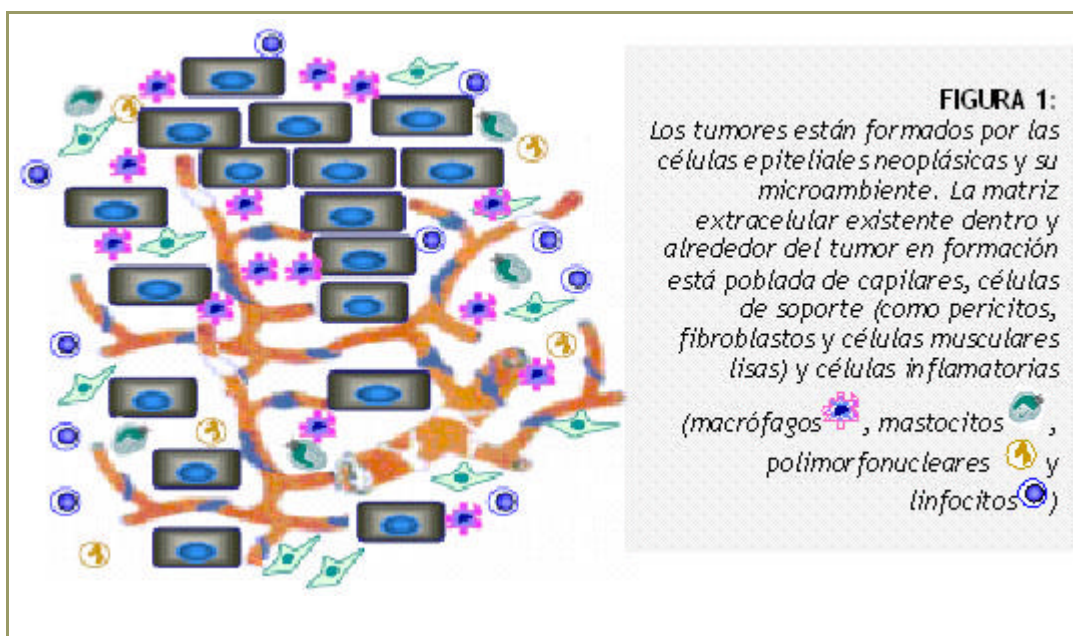
Keywords: inflammatory infiltrate; macrophages; tumors

Introducción

Cuando una serie de anormalidades moleculares afectan el ciclo celular normal, la reparación del ADN o la susceptibilidad a la apoptosis, entonces puede darse la transformación de una célula normal a una célula maligna. Sin embargo, aún cuando los defectos genéticos que una célula haya acumulado le permitan evadir los controles del ciclo celular, y dividirse, existen controles microambientales del entorno que pueden modular, controlar o generar una presión de selección (darwiniana) para que se produzca el crecimiento exponencial de las células transformadas y/o la selección de los clones malignos (Hanahan y Weinberg, 2000; Loeb et al., 2003).

Un pequeño foco neoplásico puede progresar y evadir la inmunovigilancia mediante muchos mecanismos de escape entre los que se encuentra la disminución en superficie del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Homsí J et al., 2005). Contribuyendo en este escenario, la modulación de la respuesta inflamatoria vía citoquinas, la expresión de quimioquinas y sus receptores por parte de las células tumorales pueden sumarse a las estrategias de escape (Balkwill y Mantovani, 2001).

La respuesta inmune específica contra el tumor reconoce y destruye muchas células malignas. En estos casos, el sistema inmunológico reconoce antígenos mutados, oncoembrionarios o virales asociados al tumor que generalmente despiertan una respuesta inmunológica débil. Este tipo de respuesta, es aquella que, potenciada por el uso de ciertas citoquinas o estrategias vacunales, puede ser aprovechada con fines preventivos o terapéuticos contra el tumor. Las células involucradas directamente en el rechazo tumoral son células T citotóxicas específicas, NK, NKT y en menor proporción células B productoras de anticuerpos específicos y macrófagos citotóxicos. Concomitantemente con la presencia de células mediadoras y efectoras de la inmunidad antitumoral, en algunos tipos tumorales se aprecian cantidades considerables de macrófagos y células polimorfonucleares, características de la inflamación (Figura 1). ¿Por qué las células inflamatorias se reúnen en el entorno tumoral?



Normalmente, las reacciones inflamatorias son respuestas primarias a través de las cuales se puede reparar un tejido dañado por una quemadura, herida o infección. La necrosis libera factores pro-inflamatorios y activadores de la coagulación. Existe liberación de tromboxano A₂, quimioquinas como IL-8 y se induce la actividad quimioattractante del complemento. Este cuadro en conjunto produce la llegada de leucocitos y otras células inflamatorias al sitio del daño. Allí se genera un foco donde se concentra una gran producción de citoquinas. En situaciones fisiológicas, la angiogénesis o neoformación de vasos inducida por alguno de los factores liberados contribuye a la reparación del daño.

Una vez establecido el tumor, el daño celular y la necrosis (por las acciones del sistema inmune y la velocidad de crecimiento del tumor, respectivamente), junto con la reparación del tejido dañado son procesos que se producen simultáneamente. Los motores de la reparación son la fibrosis y la angiogénesis. Entonces, remedando lo que sucede en una herida, las señales liberadas ocasionan la llegada de células inflamatorias con su bagaje aún mayor de

factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas. Para sumar a la cronicidad de este escenario, no menos frecuente es la posibilidad de que la inflamación sea también favorecida por la propia célula tumoral. Ciertos tipos celulares neoplásicos son capaces de producir constitutivamente citoquinas quimioattractantes de leucocitos (quimioquinas) (Negus et al, 1997; Moore BB et al, 1999; Taichman RS, 2002).

Las quimioquinas son una familia de citoquinas de bajo peso molecular, que son claves en la regulación de la respuesta inmune; principalmente son determinantes en el control del patrullaje de leucocitos (Wainstok, 2003). Entre las varias formas de clasificarlas para su estudio, hay una división que las separa en “homeostáticas” e “inflamatorias”. En relación a los tumores, se ha visto que son las quimioquinas inflamatorias las que se encuentran más frecuentemente producidas por las células tumorales (Zlotnik et al, 2000).

¿Cuáles son las células inflamatorias presentes en tumores sólidos?

Se ha visto que el infiltrado leucocitario acompañante es muy distinto y heterogéneo dependiendo de la estirpe tumoral; o inclusive existen tumores donde éste es casi inexistente.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en sangre periférica y son la primera línea de defensa frente a las infecciones. Son capaces de liberar factores quimiotácticos solubles y proteasas que alteran el microambiente y guían el reclutamiento de otras células tanto de la inmunidad no específica como específica (Di Carlo et al., 2001).

Los mastocitos se encuentran presentes en algunos tumores. Su presencia aporta heparina, heparanasa, histamina, metalo y serin-proteasas y varios factores de crecimiento como bFGF (*fibroblast growth factor*) y VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Estos factores tienen un valor potenciador de la angiogénesis ya que son mitógenos de componentes del estroma tumoral como lo son los fibroblastos y las células endoteliales. Pueden también favorecer la remodelación de la matriz extracelular. (Coussens et al., 1999).

Algunos trabajos han documentado la presencia de células dendríticas en tumores (Allavena P et al, 200; Vicari et al, 2002). En general, se trata de células inmaduras langerina+ que se encuentran entremezcladas en la masa de células tumorales. En cambio, las células maduras (responsables de la presentación de antígenos y la activación de linfocitos específicos) se encuentran confinadas a las zonas peritumorales. En la epidermis y área peritumoral de melanomas primarios se ha encontrado una gran población de células dendríticas CD1a+/langerina+ caracterizadas como células de Langerhans de tipo inmaduro. La ausencia de estas células maduras infiltrando intratumoralmente y el fenotipo inmaduro de las que sí acceden a la masa tumoral ponen de manifiesto una situación que redundaría en un déficit de linfocitos reactivos contra los antígenos tumorales, ya que las células dendríticas no se encuentran en condiciones de realizar la presentación antigénica (Vermi W et al., 2003). No

está clara aún la relación que tiene esta evidencia con la inmunidad sistémica y el estado de las células dendríticas que se encuentran en los ganglios.

Pero sin dudas, las células pertenecientes al linaje monocítico-macrofágico son las principales componentes de los infiltrados inflamatorios en tumores. Los macrófagos asociados a tumores (TAM, del inglés *tumor-associated macrophages*) se originan a partir de monocitos circulantes. Su reclutamiento y supervivencia in situ está propiciada por la producción de citoquinas y quimioquinas que interactúan con sus receptores (Balkwill y Mantovani, 2001). Pero debido a la plasticidad funcional que tienen los macrófagos, la presencia de diversas señales microambientales hacen que puedan poner en marcha distintos programas funcionales que pueden resultar pro o antitumorales. La clásica activación de los macrófagos que se produce en respuesta a antígenos microbianos e interferón- γ (IFN- γ) produce un fenotipo donde los macrófagos muestran características citotóxicas. En cambio, moléculas como hormonas glucocorticoideas, interleuquina-4 (IL-4), IL-10 ó IL-13 no sólo pueden resultar inhibitoras de la activación de los macrófagos sino que, en realidad, inducen la activación de un programa distinto. En analogía con la dicotomía Th1/Th2 de la respuesta por linfocitos T, se puede hablar de macrófagos **M1** o **M2** (o tipo I / tipo II) según hayan sido activados por exposición a IFN- γ o IL-4, respectivamente. La polarización de los macrófagos puede verse a nivel de producción de quimioquinas y citoquinas y de su función efectora. Así es que los macrófagos M1 son potentes efectores que destruyen microorganismos y células tumorales, produciendo grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias. En cambio, los M2 modulan la inflamación, son protumorales, promueven la remodelación de la matriz y la reparación del daño.

Cuando la inflamación beneficia al tumor

Las citoquinas/quimioquinas regulan el tráfico y función de los leucocitos a distintos órganos linfoides. Normalmente su producción es transiente y está altamente regulada. La producción constitutiva de muchas de ellas está asociada a procesos patológicos. Se ha encontrado que algunas de ellas o sus receptores son producidas por tumores. Generalmente, este rasgo tiene un impacto significativo sobre la tumorigenicidad, angiogénesis, migración de las células tumorales y formación de metástasis (Moore BB et al, 1999; Taichman RS et al., 2002; Inoue et al, 2000; Manes et al, 2003)

Siendo de gran importancia para la inflamación como para la biología tumoral, algunas quimioquinas presentan un efecto directo sobre la angiogénesis. Más específicamente, algunos miembros de las CXC quimioquinas (incluyendo CXCL8 (IL-8), Gro- α , β y γ , ENA-78, GCP y PBP) contienen una secuencia de tres aminoácidos ELR (glutamina-leucina-arginina) situada entre el N-terminal y la primera cisterna (Belperio, 2000; Strieter et al., 2006). Las quimioquinas ELR+ presentan una gran capacidad de potenciar la angiogénesis. En cambio las quimioquinas que carecen del motivo ELR son angiostáticas (entre ellas, PF-4, IP-10, MIG). No está muy

claramente determinado cuán determinantes son las propiedades promotoras o inhibitorias de estas quimioquinas en la angiogénesis tumoral (Strieter et al., 2006).

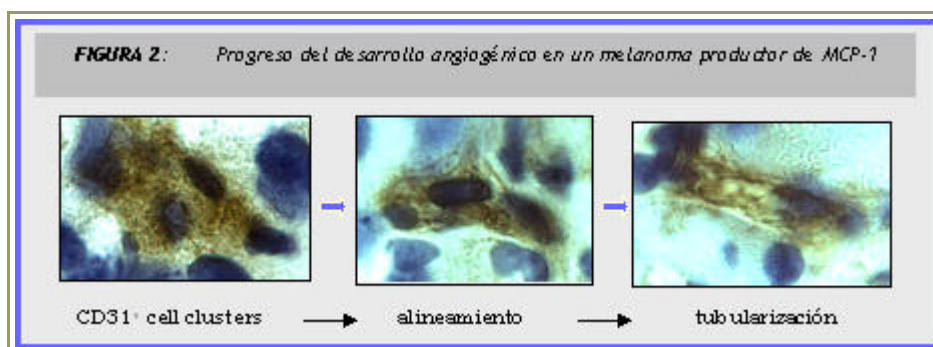
Las quimioquinas de la familia CC no son reconocidas por tener actividad angiogénica directa. Sin embargo, CCL2 o MCP-1 (del inglés, *monocyte chemoattractant protein-1*), que en condiciones fisiológicas induce la quimiotaxis de linfocitos T, células NK y macrófagos (que se activan en la fase aguda de la inflamación), es probablemente la primera excepción (Salcedo, et al, 2000; Gazzaniga et al. 2007).

MCP-1 es una de las quimioquinas más frecuentemente asociada a tumores (Nesbit et al, 2001; Ohta et al, 2003; Koide et al, 2004; Lu et al, 2006).

Las metástasis en el melanoma son la fase más agresiva de este tipo de tumor. Haciendo un estudio sobre melanoma metastático, encontramos que esta quimioquina estaba presente en el 100% de las biopsias (Gazzaniga, Tesis doctoral). Llamativamente, la presencia de macrófagos se encontraba asociada a las zonas de más activa vascularización. Sugestivamente, la zonas de mayor angiogénesis correlacionaron con la tasa mitótica del tumor, síntoma de su agresividad (Gazzaniga et al, 2006).

¿Es entonces la quimioquina per sé la que promueve el desarrollo vascular o son los factores liberados por los macrófagos reclutados? Fuese una u otra la respuesta, aquí claramente se advierte como –la recreación de una situación inflamatoria- representa para el tumor una situación sumamente ventajosa.

Pensando en explorar en mayor profundidad este interrogante, transfectamos una línea de melanoma no productora de la quimioquina con un vector de expresión para MCP-1. De esta manera, teníamos control sobre todos los factores proangiogénicos que la célula pudiese producir, a excepción de uno, el objeto de estudio; MCP-1. Las células MCP-1+ se xenoinplantaron subcutáneamente en ratones nude y se monitoreó la cinética de establecimiento del tumor y su vascularización. La detección por inmunohistoquímica de la molécula CD31 permite evidenciar la vascularización tumoral de manera eficiente (Vanzulli et al., 1997). Así encontramos que los tumores que expresaban MCP-1 se comportaron más agresivamente, con una mayor infiltración de macrófagos del tipo M2 y una mayor vascularización (Gazzaniga et al, 2007). En etapas tempranas del desarrollo tumoral, detectamos la presencia de células CD31+ que se ubicaban peritumoral e intratumoralmente. La mayoría de ellas se aglomeraban formando “clusters”; luego se disponían en estructuras más elongadas, que adquirían su luz vascular concomitantemente con el establecimiento del tumor (Figura 2, Gazzaniga S, resultados no publicados).



Al suprimir la llegada de macrófagos mediante estrategias farmacológicas, la vascularización se redujo notablemente (Figura 4); pero la presencia de vasos muy pequeños y rudimentarios sugería que MCP-1 tiene capacidad propia –aunque poco potente- para inducir desarrollo vascular. Encontramos que MCP-1 no induce la proliferación de las células endoteliales microvasculares sino que las insta a organizarse formando estructuras tubulares (Figuras 2 y 3). Con lo cual MCP-1 orchestra el reclutamiento de macrófagos M2, induce a las células endoteliales a organizarse para estructurar vasos, evento que se adyuva con los factores angiogénicos provistos por macrófagos (como TNF alfa e IL-1) (Torisu et al., 2000; Gazzaniga et al, 2007).

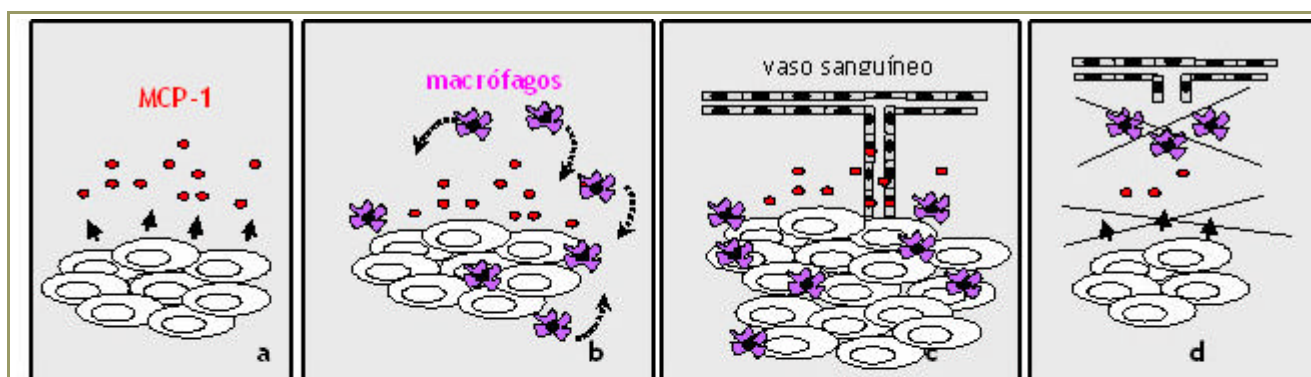


FIGURA 3:

(a) Las células tumorales liberan MCP-1 que es una molécula que atrae macrófagos al sitio del tumor. (b) En el ambiente tumoral, los macrófagos son instruidos para producir factores promotores de la vascularización. (c) El tumor recibe mayor perfusión de oxígeno y nutrientes y crece más rápidamente. (d) Bloqueando la producción de MCP-1 o eliminando los macrófagos mediante el empleo de dos drogas distintas, se logra frenar el desarrollo vascular y en consecuencia el crecimiento del tumor.

La cara favorable de la inflamación

En el caso del carcinoma medular no metastático existe un pronóstico favorable cuando se encuentra un infiltrado linfóide intenso (Hadden JW, 1999). En el mismo sentido, para el caso tumores colorrectales existen reportes de que el infiltrado linfóide intratumoral y un bajo índice de vascularización se correlacionan con un mejor pronóstico (Baeten CI et al., 2006).

Querer y no poder: cuando los leucocitos fallan en acceder e infiltrar algunos tumores.

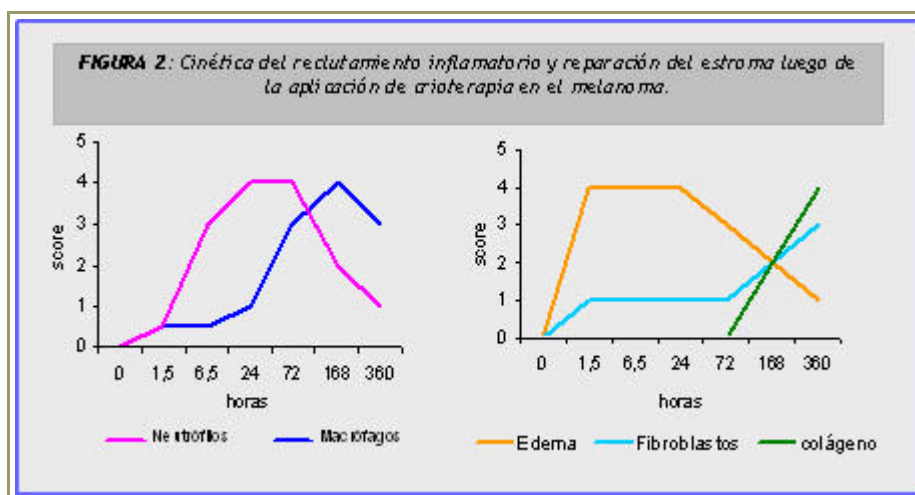
Normalmente, la presencia de leucocitos en los sitios de infiltración inflamatoria requiere de su activación local y la de las células endoteliales en forma coordinada y con una definida secuencia temporal. Esto permite la adhesión de los leucocitos al endotelio, su rodamiento y la extravasación hacia el tejido circundante. Además el éxito en el reclutamiento leucocitario involucra un balance entre agonistas (como por ejemplo citoquinas proinflamatorias y quimioquinas específicas para atraer ciertos subtipos de leucocitos [ver Química Viva, vol 2 número 2, 2003]) y los antagonistas (como son las citoquinas anti-inflamatorias).

En el caso de tumores, se observaron alteraciones en la cascada de extravasación celular (fallas en el *rolling* y la adhesión) a través del endotelio tumoral pero no en tejidos normales del mismo animal. La ausencia de moléculas de adhesión que se activen, hace que los leucocitos fracasen en el intento de acceder al nido tumoral. Por lo tanto, permanecen localizados en la periferia o en el septo fibroso del mismo. Por ello, si lo que sucede en el tumor es una falta de balance en los mecanismos de infiltración leucocitaria, la inmunidad antitumoral, las inmunoterapias que apuntan a la activación de los leucocitos infiltrantes o terapias adoptivas con linfocitos específicos pueden tener poco éxito clínico o fracasar. (Carlos TM, 2001).

Asimismo, la vasculatura en los tumores sólidos se desarrolla en forma aberrante y caótica, con pérdida de la jerarquía vascular y con evidencias de una adhesión reducida de los leucocitos al endotelio tumoral (Quarumby et al., 1999). Inclusive, existen trabajos donde se demuestra que ciertas moléculas angiogénicas presentes en el entorno tumoral pueden suprimir la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio del tumor (Griffioen, A, 1997).

Pero ¿qué es lo que se puede hacer cuando los leucocitos no logran acceder al macizo tumoral?

En general, las terapias existentes actualmente para el tratamiento de tumores reducen el tamaño tumoral produciendo necrosis o apoptosis de las células tumorales. Si se realiza algún tipo de injuria o daño en el entorno tumoral o al tumor en sí mismo, todos los tipos leucocitarios pueden encontrarse con secuencia temporal diferente. Hemos demostrado que, cuando un tumor con escaso a nulo infiltrado inflamatorio xenotransplantado en ratones *nude* es tratado con crioterapia (aplicación de spray de nitrógeno líquido), la cinética de reclutamiento inflamatorio responde a lo descrito en la Figura 4. Además, encontramos que los leucocitos lograban acceder e infiltrar la masa intratumoral en forma significativa (Gazzaniga et al., 2001).



Por su parte, la radiación en el tejido normal causa una respuesta inflamatoria que incluye la liberación de citoquinas, aumento de las moléculas de adhesión y subsecuente incremento de la adhesión de leucocitos (Heckmann et al., 1998; Quarmby et al., 1999). Resultados semejantes se consiguen con irradiación (en dosis bajas) de la masa tumoral (Gazzaniga, Tesis).

¿Podría entonces un estímulo inflamatorio agudo favorecer la llegada de los leucocitos inmuno-reactivos a la masa tumoral?

Un abordaje interesante demostró que utilizando la irradiación de baja potencia, como un generador de un ambiente inflamatorio, permitió el ingreso masivo de linfocitos reactivos que, mediante su potente capacidad antitumoral, produjeron el rechazo de los tumores (Ganss R et al, 2002). En el mismo sentido, la administración de IL-2 o interferones apuntan a poner en marcha los procesos de extravasación y activación de ciertos leucocitos. Para finalizar cabe mencionar otro abordaje realizado en modelos animales, donde se logra revertir el crecimiento de tumores establecidos apuntando a eliminar un microambiente tumoral hostil. Mediante el empleo de la quimioquina CCL16, CpG y anti-IL-10 se indujo la acumulación de células dendríticas maduras y se revirtió el ambiente inmunosupresor promoviendo la conversión de macrófagos de M2 a M1 (Guiducci et al., 2005).

Consideraciones finales

Para muchos tumores, los infiltrados inflamatorios resultan ser un brazo más articulado en beneficio propio. Los infiltrados con predominio monocítico/macrofágico representan el mayor componente inflamatorio del estroma tumoral y en este entorno, suelen desplegar un fenotipo M2, con propiedades pro-tumorales que promueven la angiogénesis, el remodelado de la matriz y la supresión de la inmunidad adaptativa. Dado que su presencia se asocia a un pronóstico menos favorable por una agresividad tumoral aumentada, esta subpoblación de macrófagos es un blanco potencial para terapias.

En general, una mejor comprensión del papel que juegan los componentes inflamatorios en los tumores puede llevar al diseño de terapias adyuvantes combinadas con los tratamientos convencionales que mejoren los resultados clínicos. La acción específica sobre ciertos mediadores inflamatorios (mediante el uso de anticuerpos, quimioquinas antagonistas, drogas específicas, etc.) podría bloquear las cascadas protumorales que se genera en el estroma circundante al tumor.

Bibliografía

Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev* 2000; 177:141–9.

Baeten CI, Castermans K, Hillen HF, Griffioen AW. Proliferating endothelial cells and leukocyte infiltration as prognostic markers in colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Nov;4(11):1351-7)

Balkwill F and Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001 Feb 17; 357(9255):539-45. Review.

Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000 Jul; 68(1):1-8. Review.

Carlos T. M. Leukocyte recruitment at sites of tumor: dissonant orchestration. *J. Leukoc. Biol*. 2001, 70: 171–184.

Coussens, L.M., W.W. Raymond, G. Bergers, M. Laig-Webster, O. Behrendtsen, Z. Werb, G. Caughey, and D. Hanahan. 1999. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*.13:1382–1397.

DiCarlo E, Fomi G, Lollini PL, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in anticancer reactions. *Blood* 2001, 97: 339–345.

Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hämmerling G. Combination of TCell Therapy and Trigger of Inflammation Induces Remodeling of the Vasculature and Tumor Eradication. *Cancer Res* 2002, March 1, 62, 1462–1470.

Gazzaniga S, Bravo A, Goldszmid SR, Maschi F, Martinelli J, Mordoh J, Wainstok R. Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice. *J Invest Dermatol*. 2001 May; 116(5):664-71.

Gazzaniga S. Modulación del infiltrado inflamatorio en el desarrollo tumoral. Efecto de citoquinas y estudio de la angiogénesis. Tesis doctoral (2003) Biblioteca Luis Federico Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Gazzaniga S, Bravo AI, Mordoh J, Wainstok R. La proteína quimioattractante de monocitos correlaciona con la angiogénesis en melanomas metastásicos. Monocyte chemoattractant protein correlates with angiogenesis in metastatic melanoma. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006; 40 (4): (en prensa).

Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, van Rooijen N, Maschi F, Vecchi A, Mantovani A, Mordoh J, Wainstok R. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol* 2007 (en prensa).

Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res* 2005; 65: 3437–46.

Griffioen A. W. Phenotype of the tumor vasculature: cell adhesion as a target for tumor therapy. *The Cancer Journal* 1997, 10: 249–255.

Hadden JW: The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int J Immunopharmacol* 1999, 21:79-101.

Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100:57–70.

Heckmann M, Douwes K, Peter R, Degitz K. Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. *Exp. Cell. Res.* 1998, 238: 148–154.

Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous Melanoma: Prognostic Factors. *Cancer Control* 2005, 12, 4: 223-229.

Inoue K, Slaton JW, Wve BY, Kim SJ, Perrote P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettway CA, Dinney CP. Interleukin-8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2104-2119.

Koide N, Nishio A, Sato T, Sugiyama A, Miyagawa S. Significance of chemoattractant protein 1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2004, 99; 1667-1674.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 776–81.

Lu Y, Cai Z, Galson D, Xiao G, Liu Y, Geroge D, Melhem M, Yao Z, Zhang J. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. *The Prostate* 2006, 66; 1311-1318.

Manes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gomez-mouton C, Jimenez- Baranda S, Garzon A, Lacalle RA, Harashman K, Ruiz A, Martinez AC. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med* 2003; 198; 1381-1389.

Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, Glass M, Wilke C, Xue YY, Sitterding S, Kunkel SL, Burdick MD, Strieter RM. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 1999 May; 154(5):1503-12.

Negus RPK, Stamp GWQ, Hadley J, BalkwillFR. Quantitative assessment of leukocyte infiltrates in ovarian cancer and its relationship to the expression of CC chemokines. *Am J Pathol* 150; 1723-1734.

Nesbit M, Schaidler H, Miller TH, Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 2001;166:6483–90.

Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1a expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2003, 22:773-778.

Quarumby S, Kumar P, Kumar S. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int. J. Cancer* 1999, 82: 385–395, 1999.

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleiman HK, Oppenheim JJ, and Murphy WJ: Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000, 96:34-40.

Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2006 Apr; 42(6):768-78. Review.

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res*. 2002 Mar 15; 62(6):1832-7.

Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF alpha and IL-1alpha. *Int J Cancer*. 2000 Jan 15; 85(2):182-8.

Vanzulli S, Gazzaniga S, Braidot MF, Vecchi A, Mantovani A, Wainstok de Calmanovici R. Detection of endothelial cells by MEC 13.3 monoclonal antibody in mice mammary tumors. *Biocell*. 1997 Apr; 21(1):39-46.

Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, Berenzi A, Cella M, Colonna M. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol*. 2003 Jun; 200(2):255-68.

Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:143-54.

Wainstok R. Quimioquinas, proteínas atractivas y promiscuas que empiezan a destacarse en el escenario de la inflamación y la inmunidad. *Revista Química Viva Volumen 2, Número 2*, septiembre de 2003. Zlotnik A y Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Review. Immunity* 2000, 12; 121-127.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Número 1, año 6, Mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar